

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520100154091

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

Pokemon 在肝癌发生发展中的作用与机制研究

**The function and mechanism of Pokemon during the
hepatocellular carcinogenesis and development**

周静平

指导教师姓名：任建林 教授

专 业 名 称：生理学

论文提交日期：2014 年 4 月

论文答辩日期：2014 年 5 月

答辩委员会主席

评阅人

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中 文 摘 要	1
英 文 摘 要	2
第一章 前言	3
第一节 信号通路 with HCC	3
1.1.1 MAPK 信号通路 with HCC	4
1.1.1.1 MAPK 信号通路概述	4
1.1.1.2 MAPK/ERK with HCC 发生、发展	6
1.1.1.3 MAPK/ERK with HCC 耐药	7
1.1.2 PI3K/AKT 信号通路 with HCC	8
1.1.2.1 PI3K/AKT 信号通路概述	8
1.1.2.2 PI3K/AKT 信号通路 with HCC 发生、发展及预后	9
第二节 细胞周期 with HCC	11
1.2.1 细胞周期概述	11
1.2.2 Cyclin with HCC	11
1.2.3 CDK with HCC	12
1.2.3.1 CDK 生物学功能	12
1.2.3.2 CDK with HCC 的发生、发展	13
1.2.4 CKI with HCC	13
1.2.4.1 P27	13
1.2.4.2 P16	15
1.2.4.3 P57	15
1.2.4.4 P21	16
第三节 缺氧诱导因子-1 with HCC	17
1.3.1 HIF-1 分子结构及生物学特性	17
1.3.1.1 HIF-1 的分子结构	17

1.3.1.2 HIF-1 的生物学特性	18
1.3.2 HIF-1 α 对肿瘤细胞的生物学作用	19
1.3.3 HIF-1 α 表达的调控机制	21
1.3.3.1 HIF-1 α 的氧依赖调节机制	21
1.3.3.2 HIF-1 α 的非氧依赖调节机制	22
1.3.4 HIF-1 α 与 HCC 的关系	23
1.3.4.1 HIF-1 α 与 HCC 的诊断及预后	23
1.3.4.2 HIF-1 α 与 HCC 耐药	24
1.3.4.3 HIF-1 α 在 HCC 治疗领域中的前景和希望	24
第四节 Pokemon 研究进展	25
1.4.1 Pokemon 概述	25
1.4.1.1 Pokemon 分子结构	25
1.4.1.2 Pokemon 的生物学功能	26
1.4.1.3 Pokemon 与肿瘤	26
1.4.1.3.1 Pokemon 与 HCC	26
1.4.1.3.2 Pokemon 与其他恶性肿瘤	27
1.4.2 Pokemon 参与肿瘤发生发展的机制	28
1.4.2.1 经典机制	28
1.4.2.2 其他作用机制	29
1.4.3 Pokemon 转录和表达的调控机制	30
1.4.4 Pokemon 在肿瘤治疗领域的前景	31
第二章 材料与方法	32
第一节 实验材料	32
2.1.1 细胞株	32
2.1.2 肝癌组织标本	32
2.1.3 试剂与药品	32
2.1.4 其他主要试剂	34
2.1.4.1 分子克隆试剂	34
2.1.4.2 Western blot 主要试剂	34

2.1.4.3 细胞培养主要试剂.....	35
2.1.5 裸鼠.....	35
2.1.6 主要设备及仪器.....	36
2.1.7 缺氧试验耗材.....	37
2.1.7.1 厌氧产气袋 (2.5L)	37
2.1.7.2 引物.....	37
第二节 实验方法	38
2.2.1 细胞培养.....	38
2.2.2 构建靶向 Pokemon 干扰质粒.....	39
2.2.3 逆转录 PCR (RT-PCR)	41
2.2.3.1 总 RNA 提取 (Trizol 法)	41
2.2.3.2 RNA 质量检测.....	41
2.2.3.3 逆转录 (RT-PCR)	42
2.2.4 细胞转染.....	43
2.2.4.1 磷酸钙转染法.....	43
2.2.4.2 梭华试剂转染.....	43
2.2.5 蛋白提取与 Western blot.....	43
2.2.6 si-Pokemon 稳转株筛选.....	46
2.2.7 细胞增殖实验.....	46
2.2.7.1 CCK8.....	46
2.2.7.2 Brdu.....	46
2.2.8 细胞侵袭实验.....	47
2.2.9 免疫组织化学.....	48
2.2.10 细胞划痕实验.....	48
2.2.11 裸鼠成瘤实验.....	49
第三章 结果与结论	50
3.1 Pokemon 在肝细胞癌组织及肝癌细胞系中的表达.....	50
3.2 基因沉默 Pokemon 的肝癌细胞稳转株 mRNA 和蛋白的验证.....	52
3.3 基因沉默 Pokemon 对肝癌细胞生物学功能的影响.....	53

3.4 Pokemon 对 PI3K/AKT、MAPK/ERK 信号通路的影响.....	55
3.5. 基因沉默 Pokemon 在缺氧条件下对 HIF-1 α 及其相关基因表达的影 响.....	57
3.6 基因沉默 Pokemon 对裸鼠皮下移植瘤生长的影响.....	61
第四章 讨 论	63
参考文献	73

Table of Content

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	2
Chapter 1 Introduction	3
Section 1 Signal pathways and HCC	3
1.1.1 MAPK signal pathway and HCC	4
1.1.1.1 Overview of MAPK signal pathway	4
1.1.1.2 MAPK/ERK take part in occurrence and progress of HCC	6
1.1.1.3 Relationship between MAPK/ERK and drug resistance of HCC	7
1.1.2 PI3K/AKT signal pathway and HCC	8
1.1.2.1 Overview of PI3K/AKT signal pathway	8
1.1.2.2 Relationship between PI3K/AKT and occurrence , progress, prognosis of HCC	9
Section 2 Cell cycle and HCC	11
1.2.1 Overview of cell cycle	11
1.2.2 Cyclin and HCC	11
1.2.3 CDK and HCC	12
1.2.3.1 Biological function of CDK	12
1.2.3.2 CDK and occurrence, development of HCC	13
1.2.4 CKI and HCC	13
1.2.4.1 P27	13
1.2.4.2 P16	15
1.2.4.3 P57	15
1.2.4.4 P21	16
Section 3 Hypoxia inducible factor-1(HIF-1) and HCC	17
1.3.1 Structure and biological characteristics of HIF-1	17
1.3.1.1 Structure of HIF-1	17

1.3.1.2 Biological characteristics of HIF-1	18
1.3.2 Biological function of HIF-1 α in tumor cells	19
1.3.3 Regulatory mechanism of HIF-1 α expression	21
1.3.3.1 Oxygen-dependent regulatory mechanism	21
1.3.3.2 Non-oxygen dependent regulatory mechanism	22
1.3.4 HIF- α and HCC.....	23
1.3.4.1 Relationship between HIF-1 α and HCC diagnosis,prognosis...	23
1.3.4.2Relationship between HIF-1 α and HCC chemotherapy resistance	24
1.3.4.3 Prospect of HIF-1 α in HCC therapy	24
Section 4 Researching progress of Pokemon	25
1.4.1 Overview of Pokemon	25
1.4.1.1 Molecular structure of Pokemon.....	25
1.4.1.2 Biological function of Pokemon	26
1.4.1.3 Pokemon and tumor	26
1.4.1.3.1 Pokemon and HCC	26
1.4.1.3.2 Pokemon and other malignant tumors	27
1.4.2 Mechanism of Pokemon in tumor occurrence and development..	28
1.4.2.1 Classical mechanism.....	28
1.4.2.2 Other mechanism	29
1.4.3 Regulatory mechanism of Pokemon transcription and expression	30
1.4.4 Prospect and future of Pokemon in tumor therapy	31
Chapter 2 Materials and Methods	32
Section 1 Materials	32
2.1.1 Cell lines	32
2.1.2 Paraffin-embedded HCC tissue specimens	32
2.1.3 Chemicals and reagents.....	32
2.1.4 Other reagents	34

2.1.4.1 Molecular clone related reagents	34
2.1.4.2 Western blot related reagents	34
2.1.4.3 Cell culture related reagents.....	35
2.1.5 Nude mice	35
2.1.6 Main equipments.....	36
2.1.7 Materials for hypoxia experiment.....	37
2.1.7.1 Hypoxia gas generating bag.....	37
2.1.7.2 Primers	37
Chapter 2 Methods	38
2.2.1 Cell culture.....	38
2.2.2 Construction of si-Pokemon plasmids	39
2.2.3 RT-PCR	41
2.2.4 Transfection.....	43
2.2.4.1 Method of calcium phosphate precipitation.....	43
2.2.4.2 So-fast transfection reagent.....	43
2.2.5 Protein preparation and Western blot.....	43
2.2.6 Establishment of stable Pokemon knockdown hepatocellular carcinoma cell(HCC) lines.....	46
2.2.7 Cell proliferation assay	46
2.2.7.1 CCK8	46
2.2.7.2 Brdu.....	46
2.2.8 Cell migration assay.....	47
2.2.9 Immunohistochemistry	48
2.2.10 Cell wound healing assay.....	48
2.2.11 Xenograft experiment	49
Chapter 3 Results and conclusions.....	50
3.1 Pokemon expression in HCC tissue and cells	50
3.2 Verification of Pokemon mRNA and protein expression in Pokmeon stably knockdown cells	52

3.3Effect of Pokemon silencing on biological function of HCC lines.....	53
3.4 Role of Pokemon in MAPK/ERK andPI3K/AKT pathways	55
3.5.Effect of Pokemon silencing on HIF-1 α and related gene expression under hypoxia.....	57
3.6 Pokemon silencing inhibits the proliferation of HepG2 cells in vivo.....	61
Chapter 4 Discussion.....	63
Reference.....	73

厦门大学博硕士论文摘要库

中文摘要

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤，肝细胞癌（HCC）是其常见类型。Pokemon 蛋白作为红系髓样生长发育因子，属 POK 转录抑制因子家族成员，在胚胎发育、细胞分化方面发挥重要作用，一些研究表明其与肿瘤发生、发展密切相关，但其具体机制尚不清楚。

本课题首先发现 Pokemon 在 HCC 组织中表达显著高于癌旁组织，并且在肝癌细胞系中表达也高于正常肝细胞。我们成功构建了干扰 Pokemon 的肝癌细胞株，发现基因沉默 Pokemon 可显著抑制肝癌细胞生长、增殖和侵袭。而这些效应可能与抑制 MAPK/ERK、PI3K/AKT 信号通路及下调 cyclinD3、CDK6 表达水平和上调 p15、p21 表达水平有关。我们进一步研究发现，缺氧条件下，基因沉默 Pokemon 可抑制缺氧诱导因子 HIF-1 α 及其某些下游靶基因的转录和表达，上调 pVHL、PHD 转录水平。最后裸鼠皮下移植瘤实验证明基因沉默 Pokemon 可抑制皮下移植瘤生长，与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

综上，我们的研究表明，Pokemon 一方面参与 MAPK、AKT 信号通路的过度激活、细胞周期蛋白及其抑制因子的异常表达，影响肝癌细胞生物学行为；另一方面 Pokemon 还参与 HIF-1 α 活性的调控，在肿瘤血管生成方面具有重要作用。本研究阐明了 Pokemon 在 HCC 发生发展中的一部分作用与机制，并证明其在相关信号通路中所起的作用，并为 Pokemon 作为 HCC 的潜在治疗靶点提供重要理论依据。

关键词：肝细胞癌；Pokemon；信号通路；细胞周期；缺氧诱导因子

Abstract

Primary hepatic carcinoma is a kind of common malignant tumors in China, of which hepatocellular carcinoma (HCC) is most familiar type. Pokemon, an erythroid myeloid ontogenic factor, is a member of the POK (POZ and Kruppel) family of transcriptional repressors, plays an important role in embryonic development and cell differentiation. Some research shows Pokemon correlates with tumorigenesis and tumor development, however specific mechanism is unclear. Our study found Pokemon expression level was higher in HCC than in adjacent noncarcinoma tissues. The expression level was higher in HepG2 and Huh-7 than normal hepatocyte. We successfully established human HepG2 and Huh-7 cell lines in which Pokemon was stably knocked down. We demonstrated that Pokemon silencing inhibited cell proliferation and migration. Pokemon knockdown inhibited MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways and modulated the expression of various cell cycle regulators in HepG2 and Huh-7 cells. We also found that Pokemon silencing not only repressed HIF-1 α transcription and expression level, but also repressed HIF-1 α downstream genes transcription and expression level under hypoxia environment, up-regulated transcription level of pVHL and PHD which promote HIF-1 α degradation. Finally we confirmed that Pokemon silencing suppresses hepatocellular carcinoma growth in tumor xenograft mice. These results suggest that Pokemon promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma and accelerates tumor development in an Akt- and ERK-signaling-dependent manner. Pokemon maybe play a vital role in HIF-1 α activity regulation and tumor angiogenesis. Taken together, our study suggest Pokemon act as a potential target to develop new anticancer agents towards hepatocellular carcinoma.

Keywords: hepatocellular carcinoma; Pokemon; signal pathway; cell cycle; HIF

第一章 前言

原发性肝癌是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的恶性肿瘤，是我国常见的恶性肿瘤之一。肝细胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）是原发性肝癌的常见类型，每年超过 60 万人被诊断 HCC，其死亡率占恶性肿瘤的第三位[1]。目前 HCC 的病因和发病机制尚未完全肯定，已知的 HBV、HCV 感染、黄曲霉毒素与 HCC 发生密切相关，认为 HBV、HCV 慢性感染及黄曲霉毒素引发的癌基因的激活和抑癌基因的失活以及由此引发的多种信号通路的过度激活（如 MAPK、PI3K/AKT 等）参与 HCC 的发生发展[2]。缺氧在 HCC 发生发展中也扮演着重要角色，参与调控血管形成、细胞能量代谢、上皮-间充质转换、侵袭转移等。Pokemon 是由 Zbtb7 基因编码的蛋白，参与多种基因的转录调控，在胚胎发育、细胞增殖、分化发挥重要作用[3; 4]，近来有研究发现其与肿瘤发生、发展也有着密切的关系；Pokemon 在人类多种肿瘤中呈高表达，被认为是原癌基因[5]；针对 Pokemon 的靶向治疗在动物实验中显示良好的抑制肿瘤生长作用[6]，因此有望成为肿瘤诊治的新靶标。本文就 Pokemon 在 HCC 发生、发展中的作用及其机制做初步的探讨和研究。

第一节 信号通路 with HCC

HCC 发生、发展是一个多因素、多步骤的复杂过程，目前认为由病毒、酒精、化学致癌物等多种病因作用下，肝细胞经历坏死、再生、假小叶形成、大量纤维结缔组织代替正常肝细胞等一系列过程，伴随原癌基因激活、抑癌基因失活引起的肝细胞生长失控发展而来，在这一过程中往往伴随信号通路的异常调控[7; 8; 9]。信号通路是指能将细胞外分子信号经细胞膜传入细胞内发挥效应的一系列酶促反应通路，调控肝细胞正常生长、分化、增殖和凋亡，目前已成为肝癌诊断和发病机制的研究热点，也是目前抗癌药物筛选和治疗中的关键靶点，阻断某些

关键信号通路关键靶点已经成功应用于临床，为肝癌治疗带来曙光。在这些信号通路中 MAPK、PI3K/AKT、VEGF、IGF、Wnt/ β -catenin 等信号通路是该领域的研究热点[2]。如图 2。

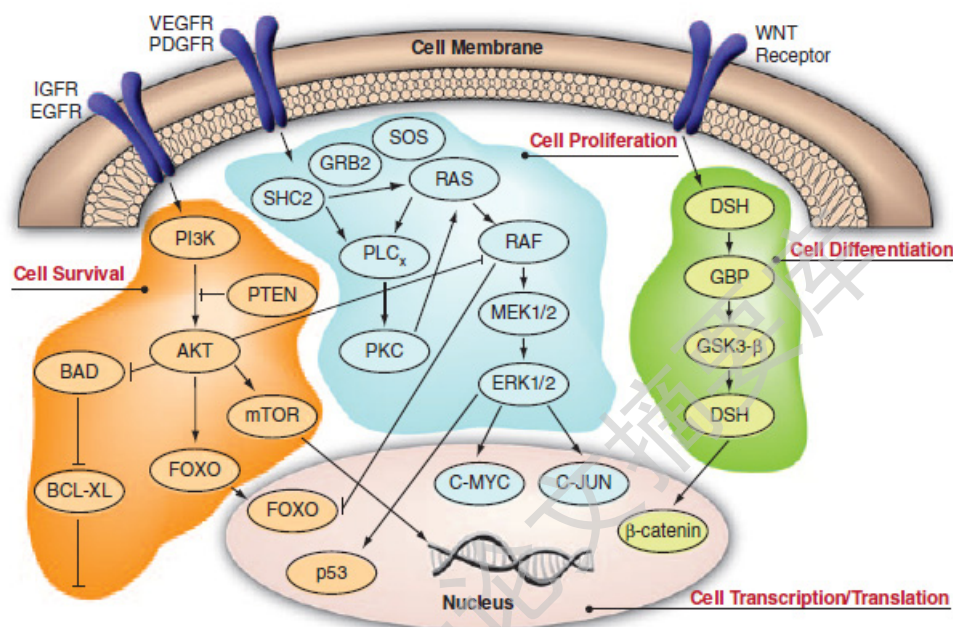


图 1.1 参与肝癌发生的细胞信号通路（引自文献【2】）

Fig.1.1 Cellular signaling pathways implicated in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma

1.1.1 MAPK 信号通路与 HCC

1.1.1.1 MAPK 信号通路概述

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路是生物体内重要的信号转导系统之一，参与介导细胞生长、发育、分裂、分化等多种生理及病理过程。几乎广泛表达于所有哺乳动物细胞，将细胞外各种刺激信号如生长因子、细胞因子、神经递质、细胞应激等信号传入胞内。这些信号通路异常激活参与人类多种肿瘤的发生发展，同时这些信号通路也是肿瘤治疗领域潜在的治疗靶点[10]。MAPK 至少有 4 个亚家族包括 ERK1/2、JNK、p38、和 ERK5。目前研究比较透彻的是 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路。它是由一个小的 GTP 结

合蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞浆内蛋白激酶组成的级联反应。MAPK 信号通路的核心包括 3 种蛋白激酶：(1)MAPKKK，是一类丝/苏氨酸蛋白激酶，RAF 为其中重要成员；(2)MAPKK，具有磷酸化苏/酪氨酸残基的双特异功能，MEK 为其中重要一员；(3)MAPK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶，ERK 为其中重要成员。这三种激酶依次激活，共同调节细胞生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要细胞生理及病理过程，在胚胎发育、组织稳态和炎症应答中发挥重要作用。首先 Ras 在胞外信号刺激下转化为活化型的 Ras，活化的 Ras 磷酸化 Raf，活化的 Raf 进而激活 Mek，Mek 最后磷酸化 ERK，活化的 ERK 进入胞核，启动相应靶基因转录。Raf 激酶通过级联放化学反应将细胞外刺激信号传至细胞内，从而调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移等一系列生理过程。如图 3 所示。

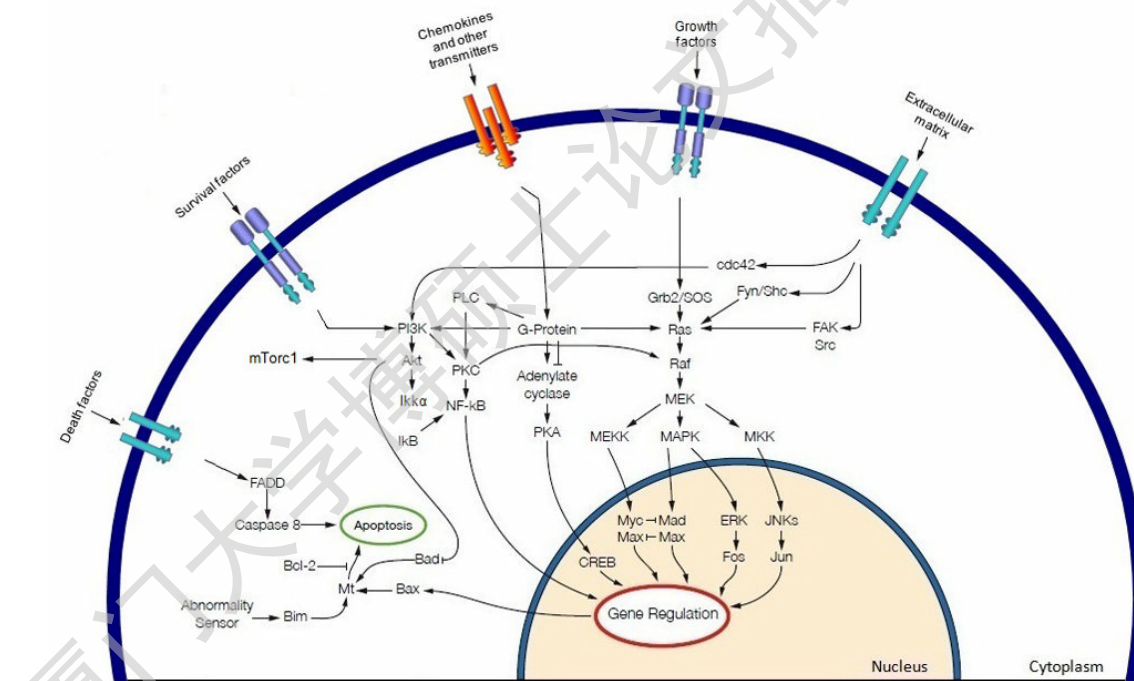


图 1.2 MAPK 级联信号通路的激活示意图（引自文献【38】）

Fig 1.2 Schematic representation of the MAPK cascade activation and potential crosstalk signals.

ERK 是 MAPK 家族中重要成员，ERK1 与 ERK2 在结构上具有高度同源性，拥有 88%相似的氨基酸序列，含有丝/苏氨酸激酶，ERK1/2 最早发现在调控细胞周期和细胞增殖中发挥重要作用，通过多个环节影响 G1/S 转换：上调细胞周期素 D1 (cyclinD1)，稳定 CyclinD-Cdk4 复合物，下调 Sox、6JunD 等抗增殖基因

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库